

## TaqMan® Small RNA Assay

TaqMan® MicroRNA Assay、TaqMan® siRNA Assay および Custom TaqMan® Small RNA Assay

**注意：**安全およびバイオハザードに関するガイドラインについては、TaqMan® Small RNA Assay プロトコール（製品番号 4364031）の「安全性」のセクションをご参照ください。すべての化学物質について安全性データシート（SDS）を読み、取扱説明書に従ってください。適切な保護眼鏡、保護衣および保護手袋を着用してください。

### 逆転写（RT）を行う

- 1 total RNA を調製する**
  - a. total RNA を抽出します。  
small RNA が保存されるような方法を利用してください。small RNA より長いコントロール転写物（snoRNA）のロスを防ぐためには、サイズによる選別を行わないことを推奨します。
  - b. サンプル中に含まれる total RNA 量を定量します。

- 2 RT マスターミックスを調製する**
  - a. TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit の試薬を氷上で解凍します。100mM dNTPs と 10X Reverse Transcription Buffer は解凍後チューブを穏やかに反転して混合しスピンドウンした後、氷上に戻します。MultiScribe™ Reverse Transcriptase と RNase Inhibitor はスピンドウンのみ行い、氷上に戻します。
  - b. RT 反応数に応じて以下の表に記載されている容量を調整し、氷上でポリプロピレン製チューブ内に RT マスターミックスを調製します。ピペッティングによるロスを考慮して、10~20%過剰に調製することを推奨します。

試薬	反応液15 µLあたりの マスターミックス容量†
100 mM dNTPs (with dTTP)	0.15 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1.00 µL
10× Reverse Transcription Buffer	1.50 µL
RNase Inhibitor, 20 U/µL	0.19 µL
Nuclease-Free Water	4.16 µL
<b>合計</b>	<b>7.00 µL</b>

† マスターミックス7 µLに5× RT Primer 3 µLとRNAサンプル5 µLを加えるので、合成RT反応液は15 µLになります。

- c. 穏やかに混合します。遠心して、溶液をチューブの底に落としてください。
  - d. RT マスターミックスは、RNA 反応液を調製するまで氷上に置きます。
- 3 RT 反応液を調製する**
  - a. 5× RT Primer と RNA テンプレートを氷上で解凍します。使用前に RT Primer のチューブをボルテックスして混合した後、スピンドウンしてください。
  - b. 定量しようとする RNA の種類によって、以下の指示に従ってください。
    - Ambion Silencer® Select siRNA を定量する場合は、**ステップ c**に進んでください。
    - その他のすべてのテンプレートについては、**ステップ d**に進んでください。

### 3 RT 反応液を調製する (続き)

- c. Ambion *Silencer*® Select siRNA を定量する場合には、二本鎖テンプレートを変性および調製します。
1. 15  $\mu\text{L}$  の各 RT 反応液につき、0.2 mL 反応チューブまたは 96 ウェルの反応プレート内で 5 $\times$  RT Primer 3  $\mu\text{L}$  と二本鎖テンプレート 5  $\mu\text{L}$  を混合します。
  2. チューブまたはプレートを 85°C で 5 分間インキュベート後、60°C で 5 分間インキュベートします。
  3. 変性後のテンプレートを氷上に置きます。
  4. 15  $\mu\text{L}$  の各 RT 反応液につき、以下の比率で RT マスターミックスに変性後の RNA と RT Primer を混合します。  
RT マスターミックス 7  $\mu\text{L}$  : 変性後の RNA および RT プライマー 8  $\mu\text{L}$  (1 反応あたりの RNA 量は 1~10 ng)
  5. **ステップ e** に進んでください。
- d. 一本鎖 RNA を調製している場合には、total RNA テンプレートを調製します。
1. 15  $\mu\text{L}$  の各 RT 反応液につき、以下の比率で RT マスターミックスと total RNA 1~10 ng を混合します。  
RT マスターミックス 7  $\mu\text{L}$  : total RNA 5  $\mu\text{L}$
  2. 穏やかに混合した後、スピンドウンして溶液をチューブの底に落とします。
  3. RT マスターミックス-total RNA 混合液 12.0  $\mu\text{L}$  を 0.2 mL 反応チューブまたは 96 ウェルの反応プレートに移します。
  4. 各アッセイのセットに付属の 5 $\times$  RT Primer 3  $\mu\text{L}$  を対応する RT 反応チューブまたはウェルに加えます。
  5. **ステップ e** に進んでください。
- e. 反応チューブまたは反応プレートを密閉した後で穏やかに混合し、スピンドウンします。
- f. 反応液を氷上で 5 分間インキュベートした後、サーマルサイクラーにセットするまで氷上に置きます。

### 4 逆転写を行う

反応チューブまたは反応プレートをサーマルサイクラーにセットした後、以下の条件で逆転写を行います。

- モード : Standard
- 反応液量 : 15  $\mu\text{L}$
- サーマルサイクリング条件 :

ステップ	時間	温度
ホールド	30 min	16°C
ホールド	30 min	42°C
ホールド	5 min	85°C
ホールド	$\infty$	4°C

## 定量 PCR (qPCR) 増幅

## 1 qPCR 反応液の調製

- 各試薬を氷上に置きます。チューブを穏やかに反転して混合しスピンドウンした後、氷上に戻します。
- 反応液量 20 µL と反応数から、必要な容量を算出します。

**注意：**各反応は 3 反復で実施することを推奨します。また試薬を移すときに生じるロスを考慮して、必要な容量に過剰分を含めることを推奨します。

試薬	容量 (µL)	
	反応液量20 µLの場合	3反復+20%の過剰分
TaqMan® Universal PCR Master Mix II, no UNG <sup>†</sup>	10.00 µL	36.00 µL
Nuclease-Free Water	7.67 µL	27.61 µL
TaqMan® Small RNA Assay (20×)	1.00 µL	3.60 µL
RT 反応産物	1.33 <sup>‡</sup> µL	4.80 µL
<b>合計容量</b>	<b>20.00 µL</b>	<b>72.01 µL</b>

<sup>†</sup> TaqMan Universal PCR Master Mix II with UNG は TaqMan® Small RNA Assay に対応していません。

<sup>‡</sup> 各反応液に添加できるRT産物の最大容量。

- マイクロ遠心チューブ内で反応試薬を混合します。
- 穏やかに転倒混和して混合した後、チューブまたはプレートスピンドウンします。

## 2 qPCR 反応プレートを調製する

- PCR 反応液 20 µL を反応プレートのウェルに移します。
- 反応プレートを Optical Adhesive Film または Optical Cap で密閉した後、スピンドウンします。

## 3 PCR 反応プレートのサーマルサイクリングを行う

- 以下のパラメータを使用して実験ファイルまたはプレートドキュメントを作成します。
  - モード：Standard
  - 反応液量：20 µL
  - サーマルサイクリング条件：

ステップ	AmpErase® UNG の活性化 (オプション) <sup>†</sup>	酵素の活性化	PCR	
	ホールド	ホールド	サーマルサイクリング (40 cycles) 変性	アニーリング/伸長
温度	50°C	95°C	95°C	60°C
時間	2 min	10 min	15 sec	60 sec

<sup>†</sup> UNG が反応液に含まれない場合は不要です

- 反応プレートをリアルタイム PCR 装置にセットします。
- ランを開始します。

## 4 実験結果を解析する

実験結果の解析については、ご利用のリアルタイム PCR システムに関するスタートガイドをご参照ください。遺伝子発現アッセイから得られたデータを解析するには、一般に以下の手順を実施します。

- Amplification Plot を表示します。
- Baseline と Threshold を設定します。

---

**For Research Use Only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.**

NOTICE TO PURCHASER: PLEASE REFER TO THE TAQMAN® SMALL RNA ASSAYS SUBMISSION GUIDELINES PROTOCOL FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION

Trademarks of Life Technologies Corporation and its affiliated companies: AB (Design)®, Applied Biosystems®, MultiScribe™, Silencer®, TaqMan, AmpErase and AmpliTaq Gold are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc. TRI Reagent is a registered trademark of Molecular Research Center, Inc.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

© 2011 Life Technologies Corporation Corporation. All rights reserved.

Part Number 4412551 Rev. C 01/2011



**Headquarters**  
5791 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008 USA  
Phone 760.603.7200  
[www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

**Technical Resources and Support**  
For the latest technical resources and support information  
for all locations, please refer to our Web site at  
[www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)